

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JPG00/05642

23.08.00

10/069343

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 8月24日

REC'D 13 OCT 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第236276号

出 願 人  
Applicant(s):

野本 亀久雄  
株式会社オルトコーポレーション

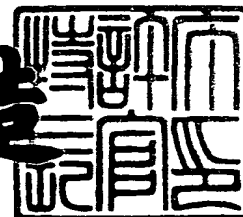
4

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3078602

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 ORTH099-B  
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿  
 【国際特許分類】 A61K 35/20  
 【発明者】  
     【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区久本 2 - 7 - 3  
     【氏名】 鎌田 直幸

【特許出願人】  
     【住所又は居所】 福岡県福岡市東区香椎駅東 3 - 2 5 - 5 2  
     【氏名又は名称】 野本 亀久雄

【特許出願人】  
     【識別番号】 597040784  
     【住所又は居所】 東京都渋谷区渋谷 1 - 3 - 1 5  
     【氏名又は名称】 株式会社オルトコーポレーション

【代理人】  
     【識別番号】 100100402  
     【弁理士】  
     【氏名又は名称】 名越 秀夫

【代理人】  
     【識別番号】 100088214  
     【弁理士】  
     【氏名又は名称】 生田 哲郎

【手数料の表示】  
     【予納台帳番号】 061230  
     【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
     【物件名】 明細書 1  
     【物件名】 要約書 1  
     【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成 11 年 8 月 20 日提出の包括委任状を援用する

【包括委任状番号】 9806149

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌方法及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗炎症因子含有免疫性物質の溶液を 5 5℃～7 0℃の温度で 3 0～6 0 分間熱処理することを特徴とする抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌方法。

【請求項 2】

抗炎症因子含有免疫性物質の溶液をポアサイズ 0. 1～0. 2 2 μ m のフィルターで濾過することを特徴とする抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 の方法で殺菌した抗炎症因子含有免疫性物質を含有する物質。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 の方法で殺菌した抗炎症因子含有免疫性物質を添加した、アイスクリーム、ヨーグルト、液体ドリンク、ジャム、バター、チーズ、クリーム、氷菓、マヨネーズ、ドレッシング、その他の食品、飲料類。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌に関するものである。特に、熱に弱い抗炎症因子含有免疫性物質をその効果を損なうことなく殺菌、滅菌する方法、及び、該方法により殺菌、滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質の利用に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来技術】

炎症というのは、「組織に傷害や破壊があったときその傷害の原因と傷害組織双方を破壊、希薄化又は隔離するような局所的反応」であって「疼痛、発熱、発赤、腫脹、機能喪失」等の兆候を伴うものである（ローランド医学大事典）。炎症が起こったときには、一般的には抗炎症薬が投与される。抗炎症薬としては、

抗ヒスタミン薬、ステロイド性及び非ステロイド性抗炎症薬、消炎酵素剤又は免疫抑制剤等が知られている。

#### 【0003】

しかしながら、これらの抗炎症薬は、それぞれに副作用や有害反応をもたらすといった問題がある。例えば、極めて一般的な抗炎症薬の一つであるサリチレート類は、特にアスピリンがよく知られているが、高投与量では中枢性呼吸麻痺及び循環虚脱を引き起こし、心窩部痛、悪心、嘔吐や消化管出血の原因になるとされる。

#### 【0004】

このような観点から、副作用、有害反応をもたらさない抗炎症剤の出現が望まれる。該副作用、有害反応のない抗炎症剤として牛乳から誘導される抗炎症薬組成物が提案され（特開昭57188523、特開昭59-161316）、更に、該抗炎症因子の分離とその抗炎症薬としての利用が提案されている（特表平2-503802、特表平8-502515、特表平8-502718、特表平10-509420）。

#### 【0005】

本発明は、上記牛乳から誘導される抗炎症因子を含む抗炎症因子含有免疫性物質を所謂健康食品として利用する技術を提供しようとするものである。ここで抗炎症因子含有免疫性物質というのは、微生物の弱毒性又は死菌、弱毒性ウイルス又は不活性化ウイルス、トキシイドを用いたアジュバンド混合ワクチンで過免疫状態とした哺乳動物の雌の乳を原料として脱脂肪、脱カゼイン後に得られる乳清から分離した、乳性蛋白画分と分子量1万以下の低分子画分とを混合した免疫性物質のことである。乳性蛋白画分や分子量1万以下の低分子画分の各画分は、乳清から、例えば、クロマトグラフィーによる分離、ゲルろ過による分離、限外ろ過による分離で得ることができる。また、特表平2-503802、特表平8-502515、特表平8-502718、特表平10-509420等に記載されている方法を利用することもできる。

#### 【0006】

該抗炎症因子含有免疫性物質は、ヒト及び動物に対して、腸内環境改善効果並

びにそれに伴う免疫強化効果及び抗炎症効果がある。該物質を溶液、粉末、顆粒又は飲食品に添加した形態等で、経口又は肛門から体内に注入することができる。具体的な効果としては、腸内環境改善、便秘改善、大腸ガンの予防と治療、日和見感染の予防と治療、腫瘍性疾患の予防と治療、免疫不全症の緩和、歯周病の予防と治療、歯肉炎の予防と治療、潰瘍性疾患の予防と治療、リウマチ症状の緩和、喘息の予防と治療等があげられる。

#### 【0007】

抗炎症因子含有免疫性物質は、上記の通り、抗炎症や免疫に対して副作用を伴うことなく効果を示す有用な物質である。この抗炎症効果は、例えば、エアポーチ法によって確認することができる。エアポーチ法の原理は、以下の通りである。抗炎症作用のある物質を経口投与し、マウス皮下にエアポーチ（空気の空洞）を作成し、カラギーナン（炎症源）を注入し、遊走されてくる白血球数を測定するものである。このとき、炎症が発症すると白血球が患部に遊走され、浸潤されるので、白血球数が多いほど炎症の度合いが強いということになる。逆に、抗炎症作用が強いほど、遊走・浸潤される白血球数は少ない。

#### 【0008】

一方、抗炎症因子含有免疫性物質は、特に、熱に弱い、即ち、高温度にさらすとその効果を失うという欠点を有している。一方、多くの飲食品の殺菌、滅菌には、加熱法が採用されている。従って、抗炎症因子含有免疫性物質を健康食品として利用しようとするとき、加熱によりその活性を失うという性質は、大きな障害になる。この観点から、抗炎症因子含有免疫性物質を健康食品として利用するに当たり、抗炎症因子含有免疫性物質の効果を損なうことなく殺菌、滅菌する方法が重要な意味を持つことになる。

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、抗炎症因子含有免疫性物質の上記欠点を克服して、該物質の効果を損なうことなく、該物質を殺菌、滅菌する方法を提供しようとするものである。本発明は、更に、殺菌、滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質を健康食品として利用しようとするものである。

## 【 0 0 1 0 】

## 【課題を解決するための手段】

請求項 1 の発明は、抗炎症因子含有免疫性物質の溶液を 5 5 ～ 7 0 ℃ の温度で 3 0 ～ 6 0 分間熱処理することを特徴とする抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法である。請求項 2 の発明は、抗炎症因子含有免疫性物質の溶液をポアサイズ 0 . 1 ～ 0 . 2 2  $\mu$  m のフィルターで濾過することを特徴とする抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法である。請求項 3 の発明は、請求項 1 又は 2 の方法で殺菌した抗炎症因子含有免疫性物質を含有する物質である。請求項 4 の発明は、請求項 1 又は 2 の方法で殺菌した抗炎症因子含有免疫性物質を添加した、アイスクリーム、ヨーグルト、液体ドリンク、ジャム、バター、チーズ、クリーム、氷菓、マヨネーズ、ドレッシング、その他の食品、飲料類である。

## 【 0 0 1 1 】

抗炎症因子含有免疫性物質は比較的新しい物質であるので、該物質の性質、使用方法等に関し未だ充分明らかにされていない点が多い。抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法についても、どのような条件で処理すればよいか、分かっていない状況にある。本発明は、初めて、抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌条件を明らかにしたものである。

## 【 0 0 1 2 】

免疫グロブリンを含む乳の殺菌方法に関しては、例えば、特開平 4 - 6 6 0 5 0 に 6 2 ℃ 3 0 分間、7 5 ℃ で 1 5 秒間加熱処理する方法が記載されている。この殺菌方法は、あくまでも免疫グロブリンを含む乳に関するものであって、本願の抗炎症因子含有免疫性物質に関するものではない。従って、自ずと、抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法と免疫グロブリンを含む乳の殺菌方法とは基本的に異なるものである。

## 【 0 0 1 3 】

即ち、抗炎症因子含有免疫性物質は、脱脂肪、脱カゼイン後に得られる乳清から分離した、乳性蛋白画分と分子量 1 万以下の低分子画分とを混合した物質であって、乳に通常含有する、乳脂肪、乳糖、カゼイン等を含有しないものである。乳脂肪、乳糖、カゼイン等を含有しないときに加熱時に受ける影響は、乳脂肪

、乳糖、カゼイン等を含有する場合に比較し大きくなる。従って、乳糖、カゼイン等を含有しない場合、含有する場合の、個別の殺菌、滅菌方法が必要になることはいうまでもない。

#### 【0014】

また、本発明は、あくまでも抗炎症因子含有免疫性物質を医薬品として処方するものではなく、飲食品に適応して、所謂健康食品としての利用を目的とするものである。抗炎症因子含有免疫性物質を健康食品に加工適用するに際しては、その効果を大きく損なうことなく殺菌、滅菌する方法が重要なポイントの一つである。

#### 【0015】

抗炎症因子含有免疫性物質の効果を損なうことなく殺菌、滅菌する方法として、本発明者は、特定の範囲の温度で処理する殺菌、滅菌法及びポアサイズの小さいフィルターでろ過処理するろ過法が適していることを見出し、本発明を完成させたのである。また、これらの方法で殺菌、滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質を添加して得た飲食品を提供するものであり、該飲食品は抗炎症効果や免疫強化効果がある健康食品として有用なものである。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

本発明を、実施の形態に基づいて説明する。まず、抗炎症因子含有免疫性物質を水に溶解し水溶液を得る。水溶液の濃度は0.01～20重量%程度である。この水溶液を55～70℃の温度で30～60分間熱処理する。この処理により、抗炎症因子含有免疫性物質の抗炎症効果、免疫強化効果を損なうことなく殺菌、滅菌することができる。温度と時間は相互の関係で決められる要素があるものの、温度自身が重要である。本発明者は、処理温度が70℃を越えると、該物質の抗炎症効果が極端に低下することを認めた。また、処理温度が低すぎると、殺菌、滅菌効果が期待できなくなるので、少なくとも55℃以上の温度で処理する必要がある。抗炎症因子含有免疫性物質を殺菌、滅菌するには、55～70℃の温度範囲で処理する必要がある。

#### 【0017】

このように殺菌、滅菌した、抗炎症因子含有免疫性物質の水溶液は、このままの状態、又は、凍結乾燥や低温乾燥処理により粉末状又は濃縮溶液の状態、アイスクリーム、ヨーグルト、液体ドリンク、ジャム、バター、チーズ、クリーム、氷菓、マヨネーズ、ドレッシング、その他の食品、飲料類に添加使用することができる。上記各素材の原料に、抗炎症因子含有免疫性物質の溶液や粉末を適量添加し、それぞれの飲食品の定法に従って仕上げるのである。該抗炎症因子含有免疫性物質は、それぞれの素材に従って異なるが、概ね、固形分として1～20重量%程度であるが、これに限定されるものではない。この程度の量を添加することにより、抗炎症効果、免疫強化効果が現れる。上記の各素材は、特に高い熱を加える処理がないので、殺菌、滅菌した水溶液を効果的に使用することができる。

#### 【0018】

また、抗炎症因子含有免疫性物質水溶液をポアサイズ0.1～0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過することにより殺菌、滅菌することができる。細菌はこの目開きのフィルターを通過しないので、該フィルターで処理することにより殺菌、滅菌することができる。ここで使用するフィルターは、セルロース混合膜などからできている。ろ過操作は、抗炎症因子含有免疫性物質の濃度20%以下の水溶液を、該物質が変成しない温度、例えば、40℃以下の温度で加圧下に行う。

#### 【0019】

このように殺菌、滅菌した、抗炎症因子含有免疫性物質の水溶液は、前記の加熱殺菌、滅菌によって得た殺菌、滅菌抗炎症因子含有免疫性物質の水溶液と同様に、アイスクリーム、ヨーグルト、液体ドリンク、ジャム、バター、チーズ、クリーム、氷菓、マヨネーズ、ドレッシング、その他食品、飲料類に使用することができる。

#### 【0020】

以上、抗炎症因子含有免疫性物質の加熱又はフィルターによる殺菌、滅菌方法は、いずれも水溶液として処理している。処理するに際しては、溶液にする必要があるが、必ずしも水溶液にする必要はない。抗炎症因子含有免疫性物質の活性が損なわれない範囲に於いて、水以外の溶剤、例えば、エチルアルコール、エチ

ルアルコールの水溶液を使用することができる。

【0021】

加熱又はフィルターにより殺菌、滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質の溶液は、そのままの状態で飲食品に添加使用してもよいし、凍結乾燥又は低温乾燥により濃縮した状態又は粉末の状態に添加使用できることは既に述べた。

【0022】

殺菌、滅菌した、抗炎症因子含有免疫性物質の利用について、以下、実施形態に基づいて説明する。まず、アイスクリームについて説明する。牛乳、クリーム、卵、調味料等の原料にフィルターにより滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質を10重量%添加し、これらをホモジナイザーでよく混合し、混合したものを68℃で30分間加熱処理し滅菌する。滅菌した混合物を2～5℃に冷却後、-15℃でオーバーランし空気を抱き込ませて、アイスクリームを得た。このアイスクリームは、抗炎症効果と免疫強化効果を持つ健康食品である。また、ろ過又は加熱処理により滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質は、アイスクリーム原料混合物を滅菌処理後に添加してもよい。

【0023】

マヨネーズは、68℃で30分間熱処理して滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質（15重量%）、サラダ油、香辛料・調味料、殺菌した卵黄を混合、乳化させることにより得ることができる。同様に、健康食品として供しうるものである。ろ過により滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質も使用できることはいうまでもない。

【0024】

カカオ豆の微粉碎物に、68℃で30分間熱処理又は0.22μmポアサイズのフィルターでろ過して滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質（12重量%）、乳化剤、香辛料等を混合し、65℃の温度でテンパリングし、所定の型にモールドイングしてチョコレートを得た。該チョコレートも同様に、健康食品として供しうるものである。

【0025】

いちごと0.22μmポアサイズのフィルターでろ過して滅菌した抗炎症因子

含有免疫性物質（12重量%）とを混合し68℃に加熱した。該温度で真空濃縮した後、ペクチンを添加し、68℃で30分加熱処理して滅菌した。抗炎症因子含有免疫性物質（12重量%）は、ペクチンと同時にいちごに添加してもよい。このようにして、抗炎症因子含有免疫性物質（12重量%）を含むいちごジャムを得た。また、いちごに変えて、種々の果物類を使用し得ることはいうまでもない。

#### 【0026】

液体ドリンク剤に抗炎症因子含有免疫性物質（18重量%）を添加し、ポアサイズ0.22 $\mu$ mのフィルターでろ過することにより、抗炎症因子含有免疫性物質を含有する液体ドリンク剤を得た。また、ろ過に変えて、抗炎症因子含有免疫性物質添加後、68℃の温度で30分間加熱処理してもよい。

#### 【0027】

ヨーグルトに適用した場合について以下説明する。ヨーグルトにはプレーンヨーグルト、ハードヨーグルト、ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルト及びフローズンヨーグルト等の種類があるが、基本的なものはプレーンヨーグルトであるので、プレーンヨーグルトについて説明する。

#### 【0028】

抗炎症因子含有免疫性物質を65℃で30分処理して滅菌し、45～48℃に冷却したものを用意する。一方、乳に必要な応じて添加物を加え加温、混合し、均一化した後90～95℃の温度で殺菌処理をする。殺菌処理後乳を45～48℃に冷却し、45～48℃に冷却した抗炎症因子含有免疫性物質を乳に添加し混合し、スターターを加え混合する。混合したものを、醗酵容器に充填し醗酵させる。室温に冷却して製品とする。この過程で、乳に安定剤の水溶液及び香料を添加するとハードヨーグルトになる。また、ハードヨーグルトに於いて、醗酵後カード破碎し5～20℃に冷却後フルーツソースを加え混合して製品とするものがソフトヨーグルトである。

#### 【0029】

次に、本発明の抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法の効果について、実施例に基づいて説明する。

【0030】

【実施例1】

抗炎症作用のある物質を経口投与し、マウス皮下にエアポーチ（空気の空洞）を作成し、カラギーナン（炎症源）を注入し、遊走されてくる白血球数を測定した。この試験に使用したサンプルは次の4種である。

（1）市販ミルク：森永乳業株式会社製のスキムミルクを、精製水で60重量%の濃度に溶解したもの。

（2）S-100ミルク：26種類の病原微生物の死菌で免疫（ワクチナイズ）された牛のミルクから調製した脱脂粉乳を精製水で60重量%の濃度に溶解したもの。

（3）WPI+溶液：S-100ミルクより分離されたホエータンパク画分に同じくS-100ミルクより限外濾過分離されたMUFと呼ばれる低分子の抗炎症画分を約8：2の割合で混合したものを、精製水で0.16重量%の濃度に溶解したもの。

（4）MDF溶液：S-100ミルクよりイオン交換カラム分離された抗炎症画分を精製水で0.1重量%の濃度に溶解したもの。

【0031】

また、操作は次の通りである。

（1）9週齢のマウス(C3Hなど)を用いる。

（2）試験3週間前より、コントロール溶液（生理食塩水）、市販ミルク溶液（投与量は、個体として300mg、S-100ミルク溶液（投与量は、個体として300mg）、WPI+溶液（投与量は個体として5～30mg）、MDF溶液（投与量は、固体として5mg）を毎日0.5ml経口投与する。

（3）試験6日前、フィルターエア-2.5mlを背中に皮下注射し、エアポーチを作成する。

（4）試験3日前、フィルターエア-2.5mlを（2）と同じ場所に皮下注射し、エアポーチを固定する。

（5）試験1時間前、最後の経口投与をする。

（6）カラギーナン1mg（1W/V%溶液を0.1ml）をエアポーチ内に注

射器で注入する。

(7) 4 時間後、エアポーチ内を P B S ( 燐酸緩衝生理食塩水 ) 2 m l で 3 回、注射器を用いて、細胞を洗い出す。

(8) 洗い出した細胞含有液を遠心分離器で遠心沈殿させる。

(9) 細胞含有液が全量 1 m l になるまで、上清を捨て、よく混合する。

(10) 細胞含有液をチュルク染色する。サンプルとチュルクを 1 : 9 の割合で混合する。すると、赤血球が溶血後、白血球の核が染色される。

(11) チュルク板 ( 血球計数板 ) を用いて、白血球数を計測する。 ( 4 マス数えて平均し、 $10^4$  を掛ける ) 。

測定結果、即ち、エアポーチに浸潤した細胞数を、表 1 に示す。

【 0 0 3 2 】

【表 1】

サンプル	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均値	標準偏差	有意差
コントロール	287	355	303	280	338	361	375	313	351	329.2	29.75	—
市販ミルク	262	350	333	310	296	329	301	312	203	299.6	30.59	なし
S-100 300mg	48	55	62	81	68	88	60	76	59	66.3	10.59	P<0.005
W P I 300mg	32	31	26	27	21	30	41	48	31	31.9	5.63	P<0.005
W P I 20mg	133	109	100	90	128	113	89	121	154	115.2	16.69	P<0.005
W P I 10mg	226	248	291	299	268	271	265	254	278	266.7	16.37	P<0.005
W P I 5mg	312	256	263	321	291	301	284	300	268	288.4	18.40	P<0.05
M D F 5mg	16	21	43	18	22	15	30	32	25	24.7	6.96	P<0.005

【 0 0 3 3 】

コントロールと市販ミルクはほぼ同程度の白血球浸潤数を示した。一方、S-100 ミルク、W P I + 溶液及び M U F は、白血球浸潤数がコントロールに比較し少なく、抗炎症効果があることがわかる。また、W P I + に関して、使用量が多くなるに従い、白血球浸潤数が少なくなっており、抗炎症効果が W P I + の量に応じて変化することが分かる。ここで、W P I + というのは、本発明のいう抗炎症因子含有免疫性物質のことである。

【 0 0 3 4 】

## 【実施例 2】

抗炎症因子含有免疫性物質 2 g を採り、水に溶解し全容量が 20 ml になるように調製した。この液を更に SMUF (PH 6.6 の緩衝液) で希釈し、0.02 % 溶液とした。該溶液 1 ml を遠心チューブに分注し、75℃で 30 分、70℃で 30 分、65℃で 30 分、55℃で 30 分及び非加熱の条件で処理した。処理後、各サンプルを 10000 G で 10 分間遠心した後、それぞれのチューブから上澄み液 0.5 ml を採取した。各サンプルの上澄み液 250  $\mu$ l に等量の SMUF を混合し 0.01 % の検体液を調製した。この検体液をマイクロプレートリーダーで光学密度を測定し、別途作成した検量線と対比して、抗炎症因子の活性残存率を求めた。この結果を、表 2 に示した。活性残存率は、室温に於ける活性値を 100 として示した相対値 (%) である。

【0035】

【表 2】

処理温度 (℃)	光学密度	活性値 (ng/ml)	平均 (ng/ml)	活性残存率 (%)
75	0.076 0.064	0.22 0	0.11	0.3
70	0.269 0.271	49.7 50.21	19.95	59.3
68	0.350 0.345	70.46 69.18	69.82	82.9
65	0.366 0.367	74.56 74.82	74.69	88.7
55	0.403 0.386	84.02 79.69	81.86	97.3
室温	0.399 0.408	83.02 85.33	84.17	100.0

【0036】

表 2 から分かるように、温度 70℃を越えると、免疫強化因子の活性残存率が急激に低下し、処理温度 70℃がクリティカルポイントになっている。免疫強化

因子活性残存率は、処理 6 8℃までは 8 0 %以上を保持しているが、処理温度が 7 0℃ではほぼ半減し、処理温度が 7 5℃になると活性はほとんど残存していない。

【 0 0 3 7 】

【実施例 3】

次に、殺菌、滅菌効果について調べた。抗炎症因子含有免疫性物質 2 g を採り、水に溶解し全容量が 2 0 m l になるように調製した。この溶液に別培地で培養した大腸菌 1 コロニーを加え混合した。この検体液から一部を採り、5 5℃、6 0℃、6 5℃の各温度で 3 0 分間加熱した。残りの液体は氷温に冷却した。加熱した検体液 0. 1 m l、氷冷検体液 0. 1 m l をとり、それぞれ滅菌した P B S で 1 0 m l に希釈して植菌用サンプルとした。

【 0 0 3 8 】

普通寒天培地とマッコンキー寒天培地のそれぞれを、精製水と混合し加熱溶解し滅菌した。この培地を、滅菌されたプラスチックシャーレに流し込み、固めてそれぞれ平板培地を調製した。次に、クリーンベンチ内に滅菌した各器具を搬入し、その無菌的な状況下で植菌を行った。上記した各寒天培地上に各植菌用サンプル液 1 0 0  $\mu$  l を載せ、ガラス棒で均一に塗付した。この培地を 3 7℃のインキュベーターに入れ 2 4 時間インキュベーションした。2 4 時間経過後、発生したコロニーの数を調べた。この結果を表 3 に示した。

【 0 0 3 9 】

【表 3】

サンプル	コロニー数
非加熱	9 3
6 5℃加熱	0
6 0℃加熱	4
5 5℃加熱	3

【0 0 4 0】

普通寒天培地における非加熱サンプルでのコロニー数は 9 3 個であったのに対して、6 5℃以上の加熱サンプルではコロニーの発生は認められなかった。6 0℃加熱のサンプルでのコロニー数は 4、同じく 5 5℃では 3 であった。この結果から、5 5℃以上の加熱により殺菌できること、更に、6 5℃以上の加熱によりコロニー数はゼロ、即ち、滅菌できることがわかる。

【0 0 4 1】

以上、実施例 2 と実施例 3 との結果から、抗炎症因子の活性保持と殺菌、滅菌を両立する温度領域が 5 5～7 0℃の範囲にあることが分かる。従って、抗炎症因子の活性を損なうことなく殺菌、滅菌するには、5 5℃～7 0℃の温度範囲で処理するのがよい。

【0 0 4 2】

【実施例 4】

実施例 4 では、フィルターを用いて殺菌、滅菌する方法について説明する。フィルターとして、富士写真フィルム（株）製品、品番 FM-2 2（これは、直径が 4 7mm でポアサイズが 0. 2 2 μm である）を使用し、ろ過ユニットとしては、柴田機械科学工業株式会社のものを使用した。抗炎症因子含有免疫性物質 2 g

を採り、水に溶解し全容量が20mlになるように調製した。この溶液を10000Gで10分間遠心し、遠心上澄みを集めた。このサンプル液を、フィルターを設置して滅菌したろ過ユニットでろ過処理を行った。ろ液は、滅菌PBS（磷酸緩衝生理食塩水）を用いて希釈し、0.8%及び1.2%検体液を調製した。

【0043】

The Binding Site社製のRID（一元免疫拡散法）キットで、コントロールとしてキット中の羊アルブミン入りPBS液を使用し、抗炎症因子の活性を調べた。ウェルに各検体液を分注し室温で72時間インキュベーションをした。ノギスを用いて沈降円の直径を測定した。このデーターから計量線の式を求め、該式を用いてデーター処理を行い、各検体液中の抗炎症因子の量を算出した。この結果を、表4に示した。

【0044】

【表4】

サンプル		検出濃度 (mg/l)	活性量 (mg/g)	活性残存率 (%) (平均)	
未処理	0.8%	288.3	36.0	100.0	100.0
	1.2%	410.7	34.2	100.0	
処 理	0.8%	293.0	36.6	101.6	101.6
	1.2%	416.2	34.7	101.3	

【0045】

測定した抗炎症因子の活性については、表4にそれぞれの検出濃度、活性量、未処理サンプルを100%とした時の活性残存率、及び活性残存率の平均値を示した。各検体ともろ過処理、未処理に関らずほとんど同じ数値を示した。処理した検体の値が1%ほど高めにしているが、このキット自体が保証している再現性の範囲内にあり問題はないと判断される。ろ過処理による抗炎症因子の活性は、

ろ過操作によっては変化を受けないことが認められた。

【0046】

【実施例5】

菌数について、実施例3と同様にして測定した。即ち、抗炎症因子含有免疫性物質2gを採り、水に溶解し全容量が20mlになるように調製した。この溶液に別培地で培養した大腸菌1コロニーを加え混合した。このサンプル液の10mlをフィルターを設置して滅菌したろ過ユニットを用いて、ろ過処理を行った。ろ過処理したサンプル液0.1ml、未処理サンプル液0.1mlをそれぞれ滅菌PBSで10mlに希釈して検体とした。

【0047】

クリーンベンチ内に滅菌した各器具を搬入し、その無菌的な状況下で植菌を行った。調製した各寒天培地に、調製したそれぞれの検体液100μlを載せ、ガラス棒で均一に塗付した。この培地を37℃インキュベーターに入れ24時間インキュベーションした。24時間経過後、発生したコロニーの数を調べた。発生コロニー数の測定の結果を表5に示した。

【0048】

【表5】

サンプル	普通寒天培地	マッコンキー寒天培地
未処理	708	394
フィルター処理	0	0

【0049】

普通寒天培地におけるろ過未処理サンプルでのコロニー数は708個であったのに対して、ろ過処理サンプルでのコロニーの発生は認められなかった。マッコンキー寒天培地においても、ろ過未処理サンプルでのコロニー数は394個であ

ったのに対して、ろ過処理サンプルでのコロニーの発生は認められなかった。植菌には、一般生菌用の普通寒天培地と大腸菌群選択培地であるマッコンキー寒天培地の2種の培地を用いたが、どちらの培地もろ過未処理検体液を植えた培地には大量のコロニーが発生したが、ろ過処理した検体液を植えた培地には、菌コロニーの発生しなかった。以上からろ過処理により殺菌、滅菌ができたことがわかる。

#### 【0050】

以上により、抗炎症因子含有免疫性物質の溶液をろ過処理を行うことにより、抗炎症因子含有免疫性物質の特性を損なうことなく、殺菌、滅菌、除菌、処理が可能であることがわかる。

#### 【0051】

##### 【発明の効果】

抗炎症因子含有免疫性物質の溶液を55～70℃の温度範囲で加熱処理、又は、ポアサイズ0.1～0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過処理することにより、該物質の効果を損なうことなく、殺菌、滅菌、除菌することができる。そして、これらの処理で得た殺菌、滅菌抗炎症因子含有免疫性物質を各種飲食品に添加使用することができ、健康食品として有用なものになる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

抗炎症因子含有免疫性物質の抗炎症効果、免疫強化効果を損なうことなく、該物質の殺菌、滅菌を行う方法及びこのようにして殺菌、滅菌した該物質の健康食品としての利用を提供する。

【解決手段】

抗炎症因子含有免疫性物質の溶液を 5 5 ～ 7 0 ℃ の温度で 3 0 ～ 6 0 分間熱処理する、ポアサイズ 0 . 1 ～ 0 . 2 2  $\mu$  m のフィルターで濾過する抗炎症因子含有免疫性物質の殺菌、滅菌方法である。また、これらの方法で殺菌、滅菌した抗炎症因子含有免疫性物質を添加した、アイスクリーム、ヨーグルト、液体ドリンク、ジャム、バター、チーズ、クリーム、氷菓、マヨネーズ、ドレッシング、その他の食品、飲料類である。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第236276号
受付番号	59900813609
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成11年 8月31日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 8月24日
【特許出願人】	
【識別番号】	593219506
【住所又は居所】	福岡県福岡市東区香椎駅東3-25-52
【氏名又は名称】	野本 亀久雄
【特許出願人】	
【識別番号】	597040784
【住所又は居所】	東京都渋谷区渋谷1-3-15
【氏名又は名称】	株式会社オルトコーポレーション
【代理人】	申請人
【識別番号】	100100402
【住所又は居所】	東京都渋谷区神宮前3丁目7番5号 青山MSビル7階 生田・名越法律特許事務所
【氏名又は名称】	名越 秀夫
【代理人】	
【識別番号】	100088214
【住所又は居所】	東京都渋谷区神宮前3丁目7番5号 青山MSビル7階 生田・名越法律特許事務所
【氏名又は名称】	生田 哲郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597040784]

1. 変更年月日	1997年 3月25日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都渋谷区渋谷1-3-15
氏 名	株式会社オルトコーポレーション

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[593219506]

1. 変更年月日	1993年12月 3日
[変更理由]	新規登録
住 所	福岡県福岡市東区香椎駅東3-25-52
氏 名	野本 亀久雄

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**